



PCT/FR 2004/001663

REÇU 04 OCT. 2004

OMPI PCT

BEST AVAILABLE COPY

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 05 JUIL. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ  
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**BREVET D'INVENTION**  
**CERTIFICAT D'UTILITÉ**  
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11354\*03

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**  
**page 1/2**



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire DB 540 01/ 210502

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>30 JUIN 2003</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0307871</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE <b>30 JUIN 2003</b> PAR L'INPI		<input checked="" type="checkbox"/> <b>NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE  CABINET ORES  36 rue de St Pétersbourg 75008 PARIS	
<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif) BLOcp263/101FR			
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b>		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date _____	
ou demande de certificat d'utilité initiale		N° _____ Date _____	
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date _____	
<b>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b> UTILISATION DE COMPOSITIONS CONTENANT UNE FORME SOLUBLE D'HLA-G DANS LE TRAITEMENT DE PATHOLOGIES DU SANG.			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ</b> <b>OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE</b> <b>LA DATE DE DÉPÔT D'UNE</b> <b>DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input checked="" type="checkbox"/> <b>Personne morale</b> <input type="checkbox"/> <b>Personne physique</b>	
Nom ou dénomination sociale		COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement public	
N° SIREN		_____	
Code APE-NAF		_____	
Domicile ou siège	Rue	31-33 rue de la Fédération	
	Code postal et ville	75015 PARIS	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page



# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE  
page 2/2

BR2

REMISE EN DÉPÔT **03 MAI 2003**  
DATE  
LIEU **75 INPI PARIS**  
N° D'ENREGISTREMENT **0307871**  
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

08 540 W / 210502

<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>		
Nom	ORES	
Prénom	Béatrice	
Cabinet ou Société	CABINET ORES	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	36 rue de St Pétersbourg
	Code postal et ville	75 008 PARIS
	Pays	FRANCE
N° de téléphone (facultatif)	01.53.21.11.00.	
N° de télécopie (facultatif)	01.53.21.08.88.	
Adresse électronique (facultatif)	ores@cabinet-ores.com	
<b>7 INVENTEUR (S)</b>		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes	<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)
Établissement immédiat ou établissement différé	<input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)	Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint	<input type="checkbox"/>	
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe	<input type="checkbox"/>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) Le Mandataire,  Béatrice ORES (n° 92-4046)		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>  L. MARIELLO

## UTILISATION DE COMPOSITIONS CONTENANT UNE FORME SOLUBLE D'HLA-G DANS LE TRAITEMENT DE PATHOLOGIES DU SANG.

La présente invention est relative à l'utilisation de compositions contenant une forme soluble d'HLA-G dans le traitement de pathologies du système circulatoire (anémies et ischémies).

Les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), se divisent en plusieurs classes, les antigènes de classe I (HLA-A, HLA-B et HLA-C) qui présentent 3 domaines globulaires ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$ ), et dont le domaine  $\alpha 3$  est associé à la  $\beta 2$  microglobuline, les antigènes de classe II (HLA-DP, HLA-DQ et HLA-DR) et les antigènes de classe III (complément).

Les antigènes de classe I comprennent, outre les antigènes précités, d'autres antigènes, dits antigènes de classe I non classiques, et notamment les antigènes HLA-E, HLA-F et HLA-G.

La séquence du gène HLA-G (gène HLA-6.0) a été décrite par GERAGHTY et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 9145-9149) : il comprend 4396 paires de bases et présente une organisation intron/exon homologue à celle des gènes HLA-A, -B et -C. De manière plus précise, ce gène comprend 8 exons, 7 introns et une extrémité non traduite 3' ; les 8 exons correspondent respectivement à : exon 1 : séquence signal, exon 2 : domaine extracellulaire  $\alpha 1$ , exon 3 : domaine extracellulaire  $\alpha 2$ , exon 4 : domaine extracellulaire  $\alpha 3$ , exon 5 : région transmembranaire, exon 6 : domaine cytoplasmique I, exon 7 : domaine cytoplasmique II (non traduit), exon 8 : domaine cytoplasmique III (non traduit) et région 3' non traduite (GERAGHTY et al., précité; ELLIS et al., J. Immunol., 1990, 144, 731-735 ; KIRSZENBAUM M. et al., *Oncogeny of hematopoiesis. Aplastic anemia* Eds. E. Gluckman, L. Coulombel, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd). Toutefois, le gène HLA-G diffère des autres gènes de classe I, en ce que le codon de terminaison de traduction, en phase, est localisé au niveau du deuxième codon de l'exon 6 ; en conséquence, la région cytoplasmique de la protéine codée par ce gène HLA-6.0 est plus courte que celle des régions cytoplasmiques des protéines HLA-A, -B et -C.

Ces antigènes HLA-G sont essentiellement exprimés par les cellules cytotrophoblastiques du placenta et sont considérés comme jouant un rôle dans la

protection du fœtus (absence de rejet par la mère). En outre, dans la mesure où l'antigène HLA-G est monomorphique, il peut également être impliqué dans la croissance ou la fonction des cellules placentaires (KOVATS et al., Science, 1990, 248, 220-223).

5 D'autres recherches concernant cet antigène non classique de classe I (ISHITANI et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 3947-3951) ont montré que le transcrit primaire du gène HLA-G peut être épissé de plusieurs manières et produit au moins 3 ARNm matures distincts : le transcrit primaire d'HLA-G fournit une copie complète (G1) de 1 200 pb, un fragment de 900 pb (G2) et un fragment de 600 pb  
10 (G3).

Le transcrit G1 ne comprend pas l'exon 7 et correspond à la séquence décrite par ELLIS et al. (précité), c'est-à-dire qu'il code une protéine qui comprend une séquence signal, trois domaines externes, une région transmembranaire et une séquence cytoplasmique. L'ARNm G2 ne comprend pas l'exon 3, c'est-à-dire  
15 qu'il code une protéine dans laquelle les domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 3$  sont directement joints ; l'ARNm G3 ne contient ni l'exon 3, ni l'exon 4, c'est-à-dire qu'il code une protéine dans laquelle le domaine  $\alpha 1$  et la séquence transmembranaire sont directement joints.

L'épissage qui prévaut pour l'obtention de l'antigène HLA-G2 entraîne la jonction d'une adénine (A) (provenant du domaine codant  $\alpha 1$ ) avec une  
20 séquence AC (issue du domaine codant  $\alpha 3$ ), ce qui entraîne la création d'un codon AAC (asparagine) à la place du codon GAC (acide aspartique), rencontré au début de la séquence codant le domaine  $\alpha 3$  dans HLA-G1.

L'épissage généré pour l'obtention de HLA-G3 n'entraîne pas la formation d'un nouveau codon dans la zone d'épissage.

25 Les Auteurs de cet article ont également analysé les différentes protéines exprimées : les 3 ARNm sont traduits en protéine dans la lignée cellulaire .221-G.

Les Auteurs de cet article concluent à un rôle fondamental de la molécule HLA-G dans la protection du fœtus vis-à-vis d'une réponse immune  
30 maternelle (induction d'une tolérance immune). Certains des Inventeurs ont confirmé ce rôle : les molécules HLA-G, exprimées à la surface des trophoblastes protègent effectivement les cellules fœtales de la lyse par les cellules *natural killer* (NK)

maternelles (CAROSELLA E.D. et al., C.R. Acad. Sci., 318, 827-830 ; CAROSELLA E.D. et al ; *Immunol. Today*, 1996, 407-409).

En outre, certains des Inventeurs ont montré l'existence d'autres formes épissées d'ARNm d'HLA-G : le transcrit HLA-G4, qui n'inclut pas l'exon 4 ;  
 5 le transcrit HLA-G5, qui inclut l'intron 4, entre les exons 4 et 5, provoquant ainsi une modification du cadre de lecture, lors de la traduction de ce transcrit et en particulier l'apparition d'un codon stop, après l'acide aminé 21 de l'intron 4 ; le transcrit HLA-G6, possédant l'intron 4, mais ayant perdu l'exon 3 (KIRSZENBAUM M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 4209-4213 ; Demande Européenne EP 0 677 582 ;  
 10 KIRSZENBAUM M. et al., *Human Immunol.*, 1995, 43, 237-241 ; MOREAU P. et al., *Human Immunol.* 1995, 43, 231-236) ; et le transcrit HLA-G7 qui inclut l'intron 2, provoquant ainsi une modification du cadre de lecture, lors de la traduction de ce transcrit et l'apparition d'un codon stop après l'acide aminé 2 de l'intron 2 ; ils ont également montré que ces différents transcrits sont exprimés dans plusieurs types de  
 15 cellules humaines fœtales et adultes, notamment dans les lymphocytes (KIRSZENBAUM M. et al., *Human Immunol.*, 1995, précité ; MOREAU P. et al., *Human Immunol.* 1995, précité).

Il existe donc au moins 7 ARNms HLA-G différents qui codent potentiellement 7 isoformes d'HLA-G dont 4 membranaires (HLA-G1, G2, G3 et G4)  
 20 et 3 solubles (HLA-G5, G6 et G7).

La distribution de l'antigène HLA-G est restreinte à des sites immuns privilégiés et notamment à l'interface fœto-maternelle.

Il est maintenant bien établi que la protéine HLA-G1, liée à la membrane est principalement exprimée par les cellules du cytotrophoblaste  
 25 extravilleux dans lesquelles elle protège le fœtus des cellules immunes d'origine maternelle. Aussi bien les isoformes liées à la membrane que les isoformes solubles sont immunotolérantes, à savoir qu'elles inhibent la cytolyse médiée par les cellules NK et les CTL ainsi que la réponse T alloproliférative ; en outre, elles induisent une apoptose dans les cellules T et les cellules NK CD8<sup>+</sup>.

30 Ainsi la protéine HLA-G exerce sa fonction localement, aussi bien lorsqu'elle est exprimée à la surface des cellules que lorsqu'elle est sécrétée (action à

distance) ; elle assure ainsi l'immunosurveillance de l'organisme (Teyssier Em. Et al., Nat. Immunol., 1995, 14, 262-270).

Des études antérieures ont montré que l'expression des molécules HLA-G à la surface de cellules cibles obtenues par transfection avec des vecteurs  
5 comprenant l'ADN génomique de HLA-G, générant potentiellement tous les transcrits alternatifs, permet de protéger lesdites cellules cibles de l'activité lytique des cellules NK de la couche déciduale de l'endomètre maternel (CHUMBLEY G. et al., *Cell Immunol.*, 1994, 155, 312-322 ; DENIZ G. et al., *J. Immunol.*, 1994, 152, 4255-4261).

Les Inventeurs, poursuivant leurs travaux ont montré que certaines  
10 tumeurs solides exprimaient l'antigène HLA-G, que selon les lignées tumorales, le profil d'expression des isoformes d'HLA-G membranaires et solubles était différent et que la présence des formes membranaires HLA-G1-G4 protégeait les cellules tumorales de la lyse induite par les cellules NK (Demande FR 2 775 294).

En outre, certains des Inventeurs ont montré l'intérêt des formes  
15 solubles d'HLA-G dans le traitement des états pathologiques inflammatoires de la peau (Demande Internationale PCT WO 00/78337).

La Demanderesse a maintenant trouvé, de manière surprenante, d'autres localisations des formes solubles d'HLA-G. En particulier, ces isoformes solubles d'HLA-G sont présentes dans les cellules érythroïdes des vaisseaux  
20 placentaires du 1<sup>er</sup> trimestre de la grossesse ainsi qu'au cours de la vascularisation précoce de l'embryon et pendant toute l'érythropoïèse.

Ainsi, de manière surprenante, les Inventeurs ont montré que les isoformes solubles d'HLA-G exercent également des fonctions non-immunologiques.

C'est donc un but de l'invention de pourvoir à de nouvelles  
25 applications des isoformes solubles d'HLA-G, directement liées à leurs fonctions non-immunologiques, en particulier dans les pathologies de la circulation sanguine telles que l'anémie ou l'ischémie.

La présente invention a donc pour objet l'utilisation d'une composition comprenant au moins une isoforme soluble d'HLA-G et au moins un  
30 véhicule pharmaceutiquement acceptable, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies de la circulation du sang.

Au sens de la présente invention, on entend par pathologies de la circulation du sang aussi bien les hémoglobinopathies que les pathologies des moyens de circulation.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, lesdites pathologies du sang sont sélectionnées dans le groupe constitué par les anémies et les ischémies.

En effet, les Inventeurs ont montré l'intérêt des isoformes solubles d'HLA-G :

1. dans la prolifération, la différenciation et la maturation des érythroblastes en réticulocytes.

L'apport d'HLA-G peut stimuler la maturation des érythroblastes circulants, que l'on peut observer dans certaines des pathologies du système circulatoire (K. V. Wagner et al., Development, 2000, 127, 4949-4958 ; M. Ogawa et al., Blood, 1997, 50, 6, 1081-1092) et

2. dans la néo-vascularisation (processus angiogénique).

Conformément à l'invention, lesdites compositions se présentent sous l'une des formes suivantes :

- forme liquide, adaptée à une administration parentérale ou orale,
- forme solide, adaptée à une administration parentérale après mise en solution ou en suspension, ou à une administration orale.

Les excipients adaptés à ces deux formes sont de préférence : eau, NaCl, dextrose, glycérol, éthanol ou une combinaison de ces produits. D'autres substances telles que des agents mouillants, des agents émulsifiants ou des tampons peuvent avantageusement être ajoutés.

La présente invention a également pour objet un procédé de détection de cellules à fonction non-immunologique exprimant une isoforme soluble d'HLA-G dans un échantillon biologique, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

(1) mise en contact de l'échantillon biologique à tester, avec un panel d'anticorps sélectionné dans le groupe constitué par des anticorps dirigés contre les marqueurs suivants : isoforme soluble d'HLA-G, CD71, CD34 et CD45,

(2) sélection des cellules exprimant l'isoforme soluble d'HLA-G et



(3) détection du type de cellules à l'aide du marqueur CD71.

En effet, on peut distinguer les cellules endothéliales exprimant HLA-G et les cellules de la lignée érythroïde exprimant HLA-G, par le fait que uniquement ces dernières expriment le marqueur CD71.

5 Conformément à l'invention l'échantillon biologique est avantageusement : un échantillon de sang (détection de cellules de la lignée érythroïde circulantes) ou un échantillon de moelle osseuse.

#### Définitions

10 - Hématopoïèse primitive : dans la vésicule vitelline, dans les premiers stades du développement ; reconstitution érythromyéloïde à court terme.

- Production de cellules souches hématopoïétiques (CSH) : la région intra-embryonnaire splanchnopleura para-aortique/aorte-gonade-mésonephros (P-Sp/AGM) produit les CSH, correspondant aux précurseurs multipotents et capables d'auto-renouvellement qui vont ensuite coloniser le foie fœtal et le thymus.

15 - Hématopoïèse définitive : commence dans la moelle osseuse à partir du second trimestre de la vie intra-embryonnaire et continue pendant toute la vie adulte.

20 - Cellules érythroïdes : premières cellules hématopoïétiques à apparaître au cours de la vie intraembryonnaire, qui donneront naissance aux globules rouges matures.

25 - Vésicule vitelline (*yolk sac*) : îlots de sang qui apparaissent dans la vésicule vitelline sous la forme de groupes de cellules entre 15 et 24 jours de développement de l'embryon et qui se différencient en cellules endothéliales à partir des cellules externes des amas (*clusters*) et en cellules hématopoïétiques à partir des cellules internes.

- Hémangioblaste : précurseur commun des cellules endothéliales et des cellules hématopoïétiques présent dans la vésicule vitelline.

- Organes hématopoïétiques primaires : foie embryonnaire, moelle osseuse fœtale.

30 - Vaisseaux bourgeonnants : dans les villosités chorioniques et la partie juxta-allantoïdienne de la vésicule vitelline.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, préalablement à l'étape (1), les cellules dudit échantillon biologique sont perméabilisées ; cette étape permet aux anticorps d'accéder effectivement aux marqueurs à détecter, qui sont sécrétés dans le cytoplasme, avant leur passage dans la circulation générale (cas des isoformes solubles d'HLA-G).

Ainsi, on obtient des profils de distribution caractéristiques de cellules, comme illustré ci-après :

Cellules/marqueurs	CD71	CD34	HLA-G	CD45
<b>Ligné érythroïde :</b> (embryon, enfant et sujet adulte)				
CSH	-	+	-	+
BFU-E	+	+	+	-
CFU-E	+	-	+	-
Érythroblastes	+	-	+	-
Réticulocytes	+	-	+	-
Erythrocytes matures	-	-	-	-
- Cellules souches endothéliales	-	+	-	-
- Cellules endothéliales des Vaisseaux bourgeonnants (embryon)	-	+	+	-
- Cellules endothéliales des vaisseaux matures	-	+	-	-

En résumé :

- 10 - l'isoforme soluble d'HLA-G est exprimée dans l'ensemble des cellules de la lignée érythroïde et dans tous les organes hématopoïétiques, de l'embryon à l'adulte, alors que l'on ne la retrouve pas dans les érythrocytes matures. En outre on n'observe pas d'expression d'une isoforme soluble d'HLA-G dans les cellules souches hématopoïétiques (CSH) CD34<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup>; ceci implique que
- 15 l'isoforme soluble d'HLA-G n'a aucune action sur les cellules souches multipotentes.

On peut également noter que l'isoforme soluble d'HLA-G est produite *in vitro* lors de la différenciation de la lignée érythroïde, quel que soit le stade de maturation. Ces résultats confirment que l'isoforme soluble d'HLA-G est impliquée dans la prolifération et/ou la maturation des précurseurs de la lignée érythroïde.

- l'isoforme soluble d'HLA-G est exprimée dans les cellules endothéliales à un stade précoce chez l'embryon, alors que l'on ne la retrouve pas dans les cellules endothéliales des vaisseaux matures. En particulier, elle est détectée dans les vaisseaux bourgeonnants des villosités chorioniques et de la partie juxta-allantoïdienne de la vésicule vitelline.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 illustre la spécificité de l'anticorps 5A6G7 vis-à-vis des formes solubles d'HLA-G. La figure 1A illustre les résultats obtenus par *Western blot*. La spécificité de l'anticorps 5A6G7 a été testée sur les lignées M8-pcDNA, M8-HLA-G1, M8-HLA-G5 et M8-HLA-G6 ; en parallèle, l'anticorps 4H84 (McMaster et al., J. immunol., 1998 et Paul et al., Hum. Immunol., 2000) a été utilisé : l'anticorps 4H84 révèle 3 bandes correspondant à HLA-G1, HLA-G5, et HLA-G6 ; l'anticorps 5A6G7 révèle 2 bandes correspondant à HLA-G5 et HLA-G6. La lignée M8-pcDNA, n'exprimant pas HLA-G, n'est marquée ni par l'anticorps 4H84 ni par l'anticorps 5A6G7. La figure 1B montre les résultats obtenus par immunocytochimie. La spécificité de l'anticorps 5A6G7 a été testée sur les lignées M8-pcDNA, M8-HLA-G1, et M8-HLA-G5, en parallèle avec l'anticorps 4H84 et un contrôle isotypique. Les marquages positifs sont caractérisés par une couleur grisée. Pour chacune des trois lignées l'anticorps utilisé pour les marquages est indiqué en haut. **ligne 1** : la lignée M8-pcDNA, n'exprimant pas HLA-G, n'est marquée ni par l'anticorps 4H84, ni par l'anticorps 5A6G7. **ligne 2** : la lignée M8-HLA-G1 qui ne possède pas l'épitope reconnu par l'anticorps 5A6G7 n'est marquée que par l'anticorps 4H84. **ligne 3** : la lignée M8-HLA-G5 est marquée par les deux anticorps 4H84 et 5A6G7. (grossissement x40). La figure 1C illustre les résultats obtenus par

immunofluorescence analysée en microscopie confocale. La spécificité de l'anticorps 5A6G7 a été testée sur les lignées M8-pcDNA, M8-HLA-G1, M8-HLA-G5, FO et FO-HLA-G6. Comme attendu, les cellules M8-HLA-G5, et FO-HLA-G6 sont marquées par l'anticorps 5A6G7B12 ; alors que les cellules M8-pcDNA, M8-HLA-G1 et FO qui ne possèdent pas l'épitope reconnu par l'anticorps 5A6G7 ne sont pas marqués. L'anticorps 4H84 est un anticorps de référence reconnaissant spécifiquement toutes les isoformes HLA-G.

- la figure 2 illustre la présence des isoformes solubles HLA-G5 et G6 dans les érythroblastes des trophoblastes du premier trimestre de la grossesse. *a* :

expression des isoformes solubles par les îlots cytotrophoblastiques (*cell island trophoblast* ou CIT) mais pas par les PVT (trophoblaste périvilleux), déterminée par analyse immunohistochimique en utilisant l'anticorps 5A6G7 sur des sections de trophoblastes incluses dans de la paraffine ; *b* : analyse de l'expression des marqueurs suivants : HLA-G5/6, CD34, CD71 et CD45 sur les vaisseaux en développement,

présents dans le trophoblaste du premier trimestre par immunohistochimie ; *c* : coloration immunohistochimique d'un vaisseau différencié à partir de sections de trophoblaste d'un embryon de 32 jours avec des anticorps dirigés contre HLA-G5/G6 (5A6G7), CD34 (qui marque les cellules endothéliales (ED) des vaisseaux, CD71 qui identifie les cellules érythroïdes (ER) et CD45 qui cible à la fois les cellules myéloïdes et les cellules lymphoïdes.

- la figure 3 illustre le fait qu'HLA-G5 est présent dans les cellules érythroïdes du foie fœtal : *a* : identification de l'isoforme soluble HLAG5 par passage des protéines totales extraites de deux foies fœtaux (9 semaines et 12 semaines) sur un gel SDS-PAGE, suivi d'une immunoempreinte (immunoblotting) avec l'anticorps 5A6G7. Les cellules M8 transfectées avec l'ADN d'HLA-G5 (M8-HLA-G5) ou avec le vecteur contrôle seul (M8-pcDNA) sont utilisées respectivement comme contrôles positif et négatif ; *b* : analyse immunohistochimique d'un foie d'embryon de 32 jours avec les anticorps dirigés contre : HLA-G5 ;, CD34 et CD 45. HLA-G5 est détectée dans les cellules érythroïdes qui proviennent de la vésicule vitelline et sont présents dans la lumière des sinusoides (capillaires de l'embryon). Les cellules endothéliales sont CD45+. Quelques cellules associées aux hépatocytes sont CD34<sup>+</sup> et CD45<sup>+</sup> et

peuvent être considérées comme les premières cellules progénitrices en provenance de l'AGM.

- la figure 4 illustre le stade de l'embryon, du fœtus des enfants et des adultes analysés par immunohistochimie.

5 **Exemple 1 : Production d'un anticorps monoclonal dénommé 5A6G7, dirigé spécifiquement contre les isoformes solubles d'HLA-G**

**1.1 Obtention d'ascites**

L'anticorps monoclonal 5A6G7 est produit en utilisant des protocoles classiques à partir de splénocytes de souris Balb/c immunisées par un peptide de 21-mer synthétique correspondant à la partie C-terminale codée par l'intron 4 des formes solubles d'HLA-G, dont la séquence est : SKEGDGGIMSVRESRSLSEDL, couplé à la protéine porteuse ovalbumine (OVA).

**1.2 Phase de purification de l'anticorps monoclonal 5A6G7**

L'anticorps monoclonal 5A6G7 est purifié à partir d'ascites en utilisant la chromatographie d'affinité à la protéine A-Sépharose et peut à la fois servir à la détection, la titration, et la purification des formes solubles d'HLA-G.

**1.3 Test de spécificité pour les HLA-G5 et HLA-G6 solubles**

Les critères requis pour obtenir un anticorps ayant une bonne spécificité sont les suivants :

20 - détection des protéines de 37 kDa HLA-G5 et de 28 kDa HLA-G6 mais pas des autres isoformes HLA-G et des autres molécules de HLA de classe I présentes dans les lysats de protéines à partir de cellules M8 (cellules issues de la lignée cellulaire de mélanome M8) transfectées respectivement par le vecteur pcDNA seul, des ADNc de HLA-G1, -G2, -G3, -G4, -G5, ou -G6 ; M8-pcDNA, M8-HLA-G1, M8-HLA-G5 et M8-HLA-G6 sont des cellules issues de la lignée cellulaire de mélanome M8, transfectée avec le vecteur vide, HLA-G1, HLA-G5, ou HLA-G6, respectivement. FO et FO-HLA-G6 sont des cellules issues de la lignée cellulaire de mélanome FO, transfectée par le vecteur vide ou HLA-G6, respectivement.

30 - aucune détection des protéines HLA-A, -B, -C et -E par analyse de type *Western-blot* (immunoempreinte) des lysats de protéines à partir de lignées cellulaires humaines exprimant des types HLA de classe I différents ;

- immunoprécipitation de la protéine HLA-G5 de 37kDa à partir de surnageant cellulaire de M8-HLA-G5 ;

- coloration immunocytochimique spécifique des cellules M8-HLA-G5 et M8-HLA-G6 mais pas des autres cellules transfectées par M8-pcDNA, -HLA-G1, -G3, et -G4, ni par des cellules mononucléaires du sang périphérique provenant de plusieurs donneurs adultes en bonne santé exprimant des types de HLA de classe I distincts ;

- coloration immunohistochimique de sections tissulaires de trophoblastes inclus dans de la paraffine mais pas des coupes tissulaires d'adulte normal inclus dans de la paraffine (c'est-à-dire peau, foie, rein, duodénum). Cet anticorps monoclonal permet notablement de discriminer entre les protéines HLA-G solubles générées par décrochage des formes HLA-G membranaires qui ne contiennent pas l'épitope codé par l'intron 4 et les protéines HLA-G5/-G6 produites à partir d'ARNm épissés de façon alternative qui contiennent l'intron 4.

#### **Exemple 2 : Détection des HLA-G solubles dans les cellules circulantes des vaisseaux chorioniques provenant de placenta au stade du premier trimestre**

L'anticorps monoclonal (5A6G7) décrit dans l'exemple 1, a permis d'étudier la répartition tissulaire des isoformes solubles d'HLA-G sur des coupes de tissus. Lors d'une analyse préliminaire, le tissu placentaire au stade du premier trimestre a été analysé.

### **2.1 Matériels et méthodes**

#### **2.1.1 Tissus**

Les tissus embryonnaires et fœtaux humains ont été analysés à partir de lamelles archivées provenant de grossesses extra-utérines, de fausses-couches et d'avortements à partir de fœtus anormaux (essentiellement trisomies 21 et 18). Le stade de développement de l'embryon est estimé sur la base de plusieurs critères anatomiques selon la classification de Carnegie (O'Rahilly et al., 1987). Au total, 19 embryons, 6 fœtus et 5 adultes ont été sélectionnés et un total de 56 tissus, ont été analysés par immunohistochimie comme illustré à la figure 4.

#### **2.1.2 Anticorps monoclonaux**

- L'anticorps 5A6G7 a été préparé comme précisé à l'exemple 1.

- L'anticorps 4H84 est un anticorps de référence qui reconnaît toutes les isoformes d'HLA-G.

- Les anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur CD71 de la transferrine (Laboratoires Novocastra, UK) ont été utilisés pour identifier les cellules érythroïdes.

- Les anticorps monoclonaux dirigés contre CD34 (Laboratoires Novocastra) et CD45 (Dako, FR) permettent de détecter les cellules progénitrices hématopoïétiques alors que seul l'anticorps monoclonal dirigé contre CD34 permet de reconnaître les cellules progénitrices endothéliales.

#### 2.1.3. Cultures de cellules érythroïdes

Des cultures de cellules érythroïdes ( $1.10^5$  cellules du sang de cordon ombilical ou de cellules de moelle osseuse) sont étalées sur un milieu semi-solide contenant de la méthylcellulose, 10 % de MCL (milieu conditionné lymphocytaire) (Stem cell, Vancouver) et 2 U/ml d'EPO (Roche, FR). Ces cultures sont incubées à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % de CO<sub>2</sub>, pendant 14 jours.

La culture liquide à 2 phases est utilisée et est définie comme suit. Sommairement, les cellules (du cordon ombilical par exemple) sont isolées par centrifugation sur gradient de Ficoll 1077 (SIGMA), et mises en culture à une densité de  $10^6$  cellules/ml dans du milieu essentiel minimal alpha ( $\alpha$ -MEM, Sigma) supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal (FCS, Sigma), 1  $\mu$ g/ml de cyclosporine A (Novartis) et 10 % de milieu récupéré de cultures des lignées cellulaires de carcinome de vessie 5637 négatives pour HLA-G (ATCC n° HTB-9). Les cultures sont incubées pendant 7 jours à 37°C, sous une atmosphère à 5 % de CO<sub>2</sub>, dans de l'air avec 98 % d'humidité. Après cette culture de phase I, les cellules non-adhérentes sont récupérées, lavées, etensemencées à une densité de  $0,4 \times 10^6$  cellules/ml dans du  $\alpha$ -MEM, 30 % FCS, 1% d'albumine sérique bovine,  $10^{-5}$ M de  $\beta$ -mercaptoéthanol, 15 mM de L-glutamine,  $10^{-6}$ M de dexaméthasone, et 1 U/ml d'érythropoïétine recombinante (Epo, Roche) pendant 5-6 jours (dénommée culture de phase II).

#### 2.1.4. Analyse immunohistochimique

Des coupes de tissus déparaffinées sont soumises à un traitement de récupération d'épitope à haute température dans du tampon citrate de sodium à 10 mM (pH 6,0) en utilisant un appareil à micro-ondes du commerce pour optimiser

l'immuno-réactivité. Des coupes de tissus ont été perméabilisées en utilisant du PBS 1X avec 0,1% de saponine et 10 mM de tampon Hépès. L'activité de la peroxydase endogène est inhibée en traitant les coupes pendant 5 minutes à température ambiante avec 3% d'eau oxygénée dans de l'eau. La fixation non-spécifique est évitée par ajout  
 5 de 50 mM de Tris, 3% de BSA (Sigma), 40% de sérum humain pendant 20 minutes avant coloration avec l'anticorps primaire pendant 30 minutes à température ambiante. L'expression de la protéine HLA-G est ensuite évaluée sur une série de coupes tissulaires ou des cellules en utilisant le système de détection universel à la biotine UltraTech HRP (Immunotech, Coulter, France), selon les instructions du fabricant.  
 10 L'analyse immunocytochimique de l'expression d'HLA-G par les cellules BFU-E est réalisée sur des cellules BFU-E cytocentrifugées, qui ont été récupérées à partir des cultures en milieu semi-solide et lavées dans du PBS, avant la centrifugation.

## 2.2 Résultats

Comme le montre la figure 2a, les protéines HLA-G5 et HLA-G6  
 15 sont localisées dans les cellules de trophoblastes extravilleux. De plus et de façon surprenante, ces molécules HLA-G solubles ont été détectées par coloration à l'aide des anticorps monoclonaux 5A6G7 soit dans des cellules en contact étroit avec des vaisseaux bourgeonnants associés à des cytotrophoblastes, soit dans des cellules dépourvues d'axes villeux, ou soit dans des cellules situées dans la lumière de  
 20 vaisseaux matures (Figures 2b et 2c). Cette nouvelle localisation cellulaire des HLA-G est confirmée en utilisant un autre anticorps anti-HLA-G, l'anticorps monoclonal 87G de référence.

Afin d'identifier plus précisément ces cellules exprimant la protéine HLA-G, qui ressemblent morphologiquement à des érythroblastes, une analyse  
 25 immunohistochimique a été réalisée sur une série de coupes de trophoblastes inclus dans de la paraffine provenant d'embryons de 32 jours par détection des marqueurs suivants :

- le récepteur de la transferrine CD71 : exprimé des érythroïdes (BFU-E, *burst-forming unit*) aux réticulocytes
- 30 - le CD34 : exprimé à la fois par les cellules progénitrices endothéliales et hématopoïétiques



- le CD45 : exprimé à partir des cellules progénitrices hématopoïétiques jusqu'aux cellules matures des lignées lymphoïdes et myéloïdes
- les protéines solubles HLA-G5 et HLA-G6.

Les résultats montrent que les isoformes solubles sont exprimées par toute la sous-population de cellules érythroïdes CD71<sup>+</sup> alors que peu de cellules HLA-G<sup>+</sup> co-expriment le marqueur de cellule souche CD34 (Figures 2b et 2c).

Au contraire, les cellules endothéliales des vaisseaux chorioniques matures sont CD34<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup>, CD71<sup>-</sup> et CD45<sup>-</sup> (Figure 2c).

Ces résultats permettent effectivement de conclure à la présence des isoformes solubles d'HLA-G dans les cellules hématopoïétiques appartenant à la lignée érythropoïétique.

### **Exemple 3 : Identification de l'isoforme soluble HLA-G5 dans les érythroblastes fœtaux**

Afin de caractériser l'isoforme soluble d'HLA-G présente dans les cellules érythroïdes fœtales, l'organe dans lequel les érythroblastes sont les constituants principaux, à savoir le foie qui est le producteur principal d'hématies dans le fœtus, a été utilisé.

#### **3.1 Matériels et méthodes**

##### **3.1.1 Tissus et anticorps monoclonaux**

Les protéines sont extraites du foie obtenu à partir de 2 embryons distincts respectivement de 9 et 12 semaines. Les tissus sur lesquels portent les analyses sont ceux décrits dans l'exemple 2.

L'anticorps monoclonal 5A6G7 décrit à l'exemple 1 est utilisé pour l'analyse immunohistochimique.

##### **3.1.2 Analyse Western blot**

Des foies fœtaux de 9 et 12 semaines ont été broyés et lysés dans 50 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 150mM de NaCl, 1% de Nonidet P-40 (Sigma) contenant des inhibiteurs de protéase et du tampon froid pendant 1 heure. Les lysats de cellules transfectées par M8-HLA-G5 et M8-pc-ADN étaient utilisés comme respectivement témoins positif et négatif envers HLA-G5. Après centrifugation à 15 000g à 4°C pendant 30 minutes, les surnageants étaient supplémentés par du tampon Leammli 6X. Les échantillons sont chauffés pendant 10 minutes à 95°C avant d'être chargés sur un

gel SDS-PAGE à 12%. Les protéines sont alors électro-transférées sur une membrane en nitrocellulose (Hybond-C extra). La membrane est ensuite traitée contre les liaisons non-spécifiques par 5% de lait lyophilisé écrémé dans du PBS contenant 0,2% de Tween 20 (PBST) pendant une nuit à 4°C. Après lavage dans du PBST, la membrane est incubée avec des anticorps anti-souris conjugué à HRP pendant 30 minutes à température ambiante et lavée dans du PBST. Les protéines HLA-G sont détectées par chimio-luminescence (ECL Plus Kit) (Menier et al., *Hum. Immunol.*, 2003, 64, 315-326).

### 3.2 Résultats

Par analyse *Western blot* en utilisant l'anticorps monoclonal 5A6G7, une protéine de 37 kDa, qui correspond au poids moléculaire de la chaîne lourde de HLA-G5 (Figure 3) est identifiée. Les transfectants M8-pcDNA et M8-HLA-G5 sont utilisés respectivement comme témoins positif et négatif envers HLA-G5. Ce résultat montre que l'isoforme soluble d' HLA-G détectée dans les érythroblastes fœtaux est l'isoforme HLA-G5. En accord avec ce résultat, une analyse immunohistochimique a permis de détecter de nombreuses cellules HLA-G<sup>+</sup> (incubation avec l'anticorps monoclonal 5A6G7) dans du tissu hépatique fœtal inclus dans de la paraffine, comme détaillé dans l'exemple suivant.

#### **Exemple 4 : Répartition de l'isoforme soluble HLA-G5 à tous les organes hématopoïétiques embryonnaires et fœtaux**

La répartition de l'isoforme soluble HLA-G5 dans tous les organes hématopoïétiques embryonnaires et fœtaux a été analysée en réalisant des expériences immunohistochimiques sur des coupes d'embryons et de tissu fœtal inclus dans de la paraffine, à l'aide des anticorps monoclonaux dirigés contre HLA-G5, CD71, CD34 ou CD45.

#### **4.1 Matériels et méthodes**

Les tissus analysés proviennent d'organes hématopoïétiques embryonnaires et fœtaux tels que décrits dans l'Exemple 2.

Les anticorps monoclonaux dirigés contre HLA-G5 (5A6G7) et les marqueurs CD71, CD34 et CD45 de l'exemple 1 ont été utilisés dans les conditions précisées à l'exemple 2.

#### 4.2 Résultats

On observe la co-localisation d'HLA-G et du récepteur CD71 dans tous les organes hématopoïétiques embryonnaires et fœtaux : la vésicule vitelline, la splanchnopleure para-aortique/Aorta-Gonado-Mesonephros (SpP/AGM), le foie, la rate et la moelle osseuse ; ces résultats confirment que les cellules HLA-G<sup>+</sup> sont des érythroblastes.

	CD71	CD34	HLA-G	CD45
<b><u>Cellules érythroïdes</u></b>				
Vésicule vitelline	+	-	+	-
pSp/AGM	+	-	+	-
foie fœtal	+	-	+	-
rate	+	-	+	-
moelle osseuse	+	-	+	-

Ces résultats montrent que les cellules HLA-G<sup>+</sup> expriment également le récepteur CD71 et cette co-localisation existe pendant toute la durée du développement embryonnaire et fœtal : dans la vésicule vitelline, dans l'embryon de 16 jours, dans tous les organes hématopoïétiques d'un embryon de 32 jours, dans le foie de 12, 34 et 36 semaines, dans la moelle osseuse de 12, 14 et 16 semaines), ainsi que dans la moelle osseuse chez l'adulte. Elles sont donc bien un marqueur de la lignée érythroïde.

Ces résultats illustrent donc le rôle de l'isoforme soluble d'HLA-G dans l'érythropoïèse en tant que marqueur dans la différenciation de la lignée érythroïde.

Par ailleurs, ces résultats montrent qu'aucune cellule souche hématopoïétique CD34<sup>+</sup> n'est présente dans la vésicule vitelline d'un embryon de 16 jours contrairement aux cellules souches érythroïdes CD71<sup>+</sup>.

En effet, les cellules souches hématopoïétiques CD34<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup> sont toutes HLA-G<sup>-</sup>.

Ceci montre que HLA-G n'intervient pas sur les cellules souches multipotentes.

### **Exemple 5 : Les érythroblastes sanguins du cordon ombilical expriment HLA-G5**

Pour déterminer si l'isoforme HLA-G5 est produite directement par les érythroblastes ou bien fixée à la surface cellulaire de l'érythroblaste par l'intermédiaire de récepteurs HLA-G spécifiques, après sa production par d'autres  
5 cellules, le sang du cordon ombilical a été choisi comme source d'érythroblastes.

#### **5.1 Matériels et méthodes**

##### **5.1.1 Tissus**

Les unités de sang de cordon ombilical (p/CB) ont été obtenues lors d'accouchements à terme normaux, après le consentement éclairé des mères, à l'Unité  
10 Obstétrique de l'Hôpital Robert Debré, à Paris (France).

##### **5.1.2 Essais de cellules formant des colonies d'érythroïdes (BFU-E) en milieu semi-solide**

voir exemple 2, chapitre cultures de cellules érythroïdes.

##### **5.1.3 Maturation de cellules progénitrices dans la culture liquide à 2** 15 **phases**

Voir exemple 2, chapitre cultures de cellules érythroïdes.

La concentration en HLA-G5 dans les surnageants est évaluée par un ELISA qui mesure spécifiquement les HLA-G5/-G6.

##### **5.1.4 Test ELISA**

20 Les concentrations en HLA-G5 sont mesurées dans des surnageants de cultures liquides à deux phases à la fin des phases I et II (méthode de type « sandwich »). Des plaques de microtitration de 96 puits (Corning Costar, France) sont recouvertes d'anticorps monoclonaux 5A6G7. Après 5 lavages dans du tampon phosphate salé (PBS) contenant 0,2% de Tween 20 et 0,1% d'albumine sérique de  
25 veau (BSA, Sigma), les plaques sont saturées en PBS contenant 1% de BSA et 0,1% de Tween 20 pendant 2 heures à 37°C. Après 5 lavages dans du PBS avec 0,2% de Tween 20, 100 µl d'échantillon est ajouté dans chaque puits et testé en duplicate. Après incubation pendant 1 heure à 37°C, les boîtes sont lavées 5 fois dans du PBST (Phosphate Buffer Saline Tween). L'anticorps de détection, un anticorps monoclonal  
30 W6/32 biotinylé (Leinco Technologies Inc., Ballwin) reconnaissant un déterminant monomorphe des chaînes lourdes de HLA de classe I associées à la microglobuline β2, préalablement dilué 1/250, a été incubé pendant 1 heure à 37°C. Après lavage dans

du PBST, la révélation est réalisée par incubation dans de la streptavidine AMDEX™ conjuguée à la peroxydase de raifort (Amersham) pendant 1 heure à 37°C, puis avec du substrat TMB (3, 3', 5, 5'-tétraméthylbenzidine, Sigma) à température ambiante. La réaction est stoppée par l'ajout d'HCl 1N. Les densités optiques sont mesurées à 450 nm. Les courbes d'étalonnage sont réalisées en utilisant des dilutions en série d'HLA-G5 soluble recombinante purifiée. La concentration en HLA-G5 est déterminée à partir de la valeur de densité optique selon la courbe d'étalonnage. Les résultats sont exprimés comme les moyennes du duplicate. La limite de détection par test ELISA est de 5 ng/ml.

## 5.2 Résultats

Quelle que soit le stade de la culture, c'est à dire à partir de la cellule la plus primitive (BFU-E) jusqu'à la cellule érythroïde la plus différenciée (réticulocyte), la concentration en HLA-G5 est comprise entre 25,5 ng/ml et 44,3 ng/ml. Une analyse immunocytochimique des cellules correspondantes confirme que la culture liquide à deux phases permet la différenciation des cellules érythroïdes qui sont positives pour le CD71 et co-expriment le CD36 (récepteur à la thrombospondine et marqueur pour identifier les stades CFU-E et érythroblastes de la lignée érythroïde) à J=7 de la seconde phase de culture. D'après ces résultats, on peut donc en conclure que les molécules HLA-G5 détectées par ELISA dans des surnageants de culture étaient bien produites par les cellules érythroïdes au cours de leur différenciation.

### Exemple 6 : Les érythroblastes de la moelle osseuse adulte expriment HLA-G5

Le maintien de l'expression de l'isoforme HLA-G5 dans la lignée érythropoïétique au cours de la vie chez l'adulte a été étudié. Etant donné que l'hématopoïèse est localisée dans la moelle osseuse chez l'adulte, les cellules BFU-E ont été collectées à partir de culture semi-solide de cellules progénitrices hématopoïétiques de moelle osseuse (voir exemple 2).

## 6.1 Matériels et méthodes

### 6.1.1. Anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux suivants ont été utilisés pour détecter les HLA-G :

- 4H84 est dirigé contre le peptide 61-83 du domaine  $\alpha 1$  de HLA-G et reconnaît la chaîne lourde de HLA-G libre ;

- MEM-G/09 (Exbio, Praha, République Tchèque).

Tous ces anticorps réagissent avec une molécule de HLA-G associée à  $\beta 2m$  correctement repliée.

### 6.1.3 Méthodes

5 La technique de culture des cellules BFU-E en milieu semi-solide et l'analyse immunochimique ont été utilisées telles que décrites à l'exemple 2.

### 6.2 Résultats

L'isoforme soluble HLA-G5 est détectée dans les cellules BFU-E par analyse immunocytochimique en utilisant plusieurs anticorps monoclonaux anti-  
10 HLA-G tels que 5A6G7, MEM-G/9, et 4H84. En outre, lors d'une analyse immunochimique sur des coupes d'os inclus dans de la paraffine, HLA-G5 est alors localisée dans les érythroblastes à partir de moelle osseuse d'adulte.

#### Exemple 7 : Expression de l'isoforme soluble d'HLA-G par les cellules endothéliales embryonnaires

15 L'isoforme soluble d'HLA-G est aussi identifiée dans les cellules endothéliales dans les vaisseaux bourgeonnants à deux endroits : dans le cœur mésenchymal des villosités chorioniques et dans la partie juxta-allantoïde de la vésicule vitelline de l'embryon précoce.

20 Dans chaque cas, l'isoforme HLA-G co-localise avec le marqueur CD34.

La présence de l'isoforme soluble d'HLA-G dans les cellules endothéliales des vaisseaux bourgeonnants de villosité chorioniques et de la partie juxta-allantoïde de la vésicule vitelline montre son implication dans le processus angiogénique.

25 Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

### REVENDECATIONS

1°) Utilisation d'au moins une isoforme soluble d'HLA-G, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies de la circulation du sang.

5                    2°) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que lesdites pathologies du sang sont sélectionnées dans le groupe constitué par les anémies et les ischémies.

10                   3°) Utilisation selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que ladite isoforme soluble d'HLA-G est sous la forme d'une composition comprenant en outre au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

                    4°) Utilisation selon la revendication 3, caractérisé en ce que ladite composition est sous forme liquide.

15                   5°) Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que ladite composition est sous forme solide.

                    6°) Procédé de détection, dans un échantillon biologique, de cellules à fonction non-immunologique exprimant une isoforme soluble d'HLA-G, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

20                   (1) mise en contact de l'échantillon biologique à tester, avec un panel d'anticorps sélectionnés dans le groupe constitué par des anticorps dirigés contre les marqueurs suivants : isoforme soluble d'HLA-G, CD71, CD34 et CD45,

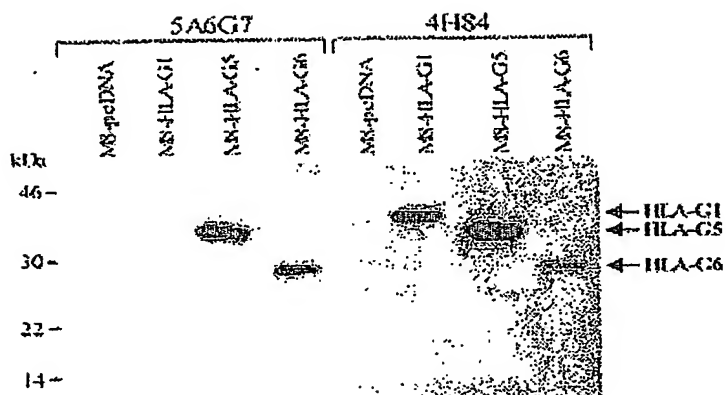
                    (2) sélection des cellules exprimant l'isoforme soluble d'HLA-G et

                    (3) détection du profil d'expression des marqueurs CD71, CD34 et CD45.

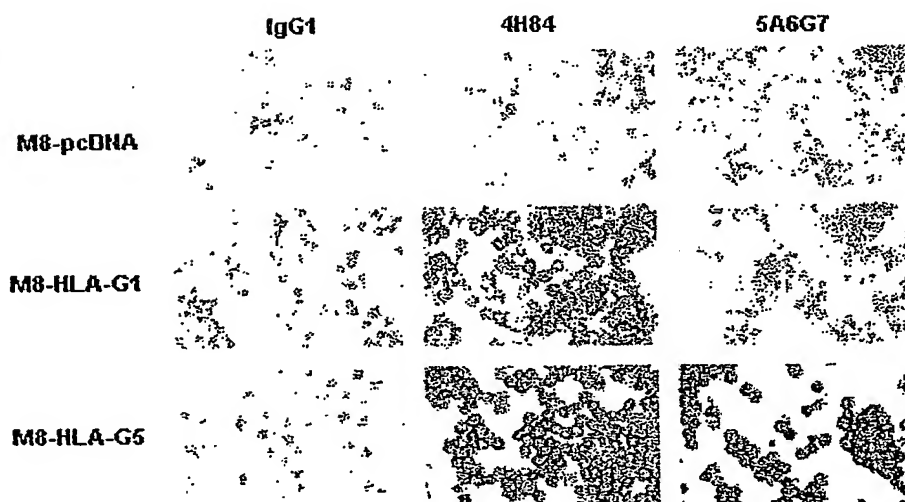
25                   7°) Procédé de détection selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'échantillon biologique est sélectionné dans le groupe constitué par un échantillon de sang ou un échantillon de moelle osseuse.

30                   8°) Procédé selon la revendication 6 ou la revendication 7, caractérisé en ce que préalablement à l'étape (1), les cellules dudit échantillon biologique sont perméabilisées.

A



B



C

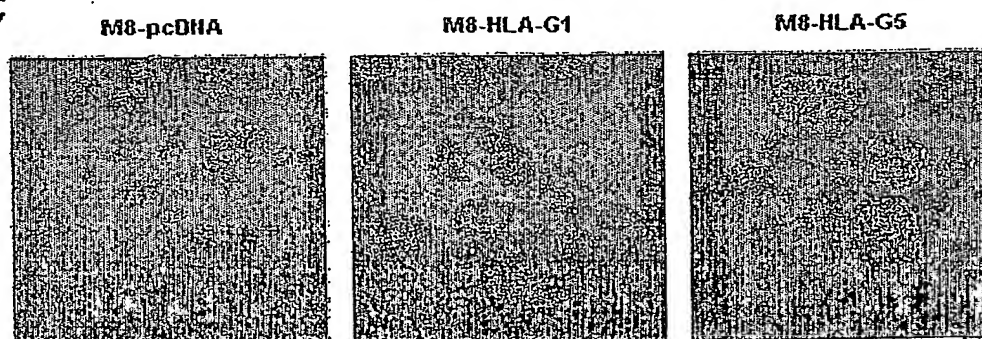


FIGURE 1



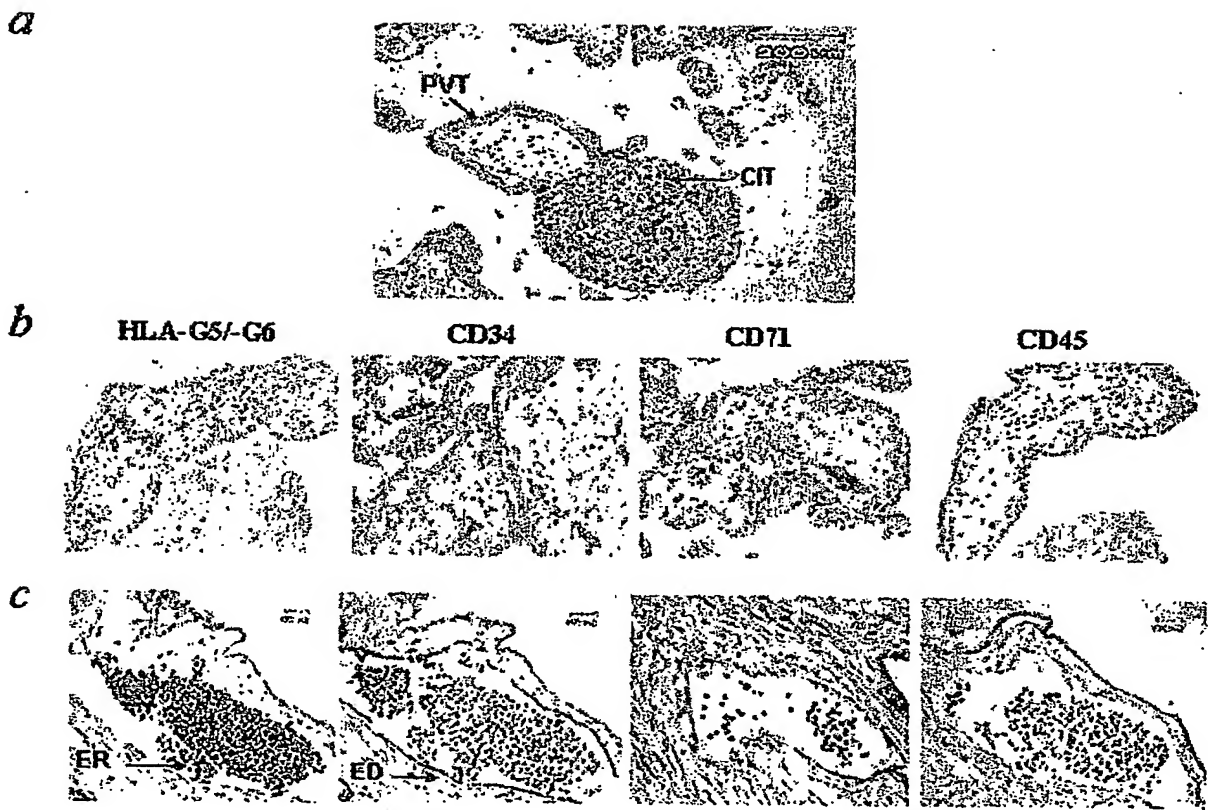
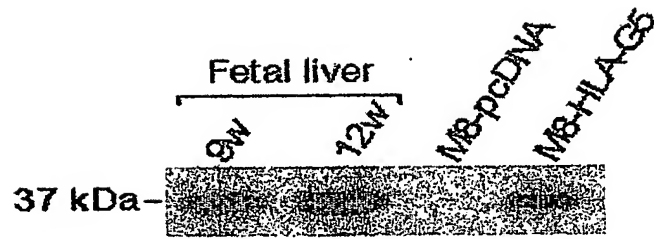


FIGURE 2

*a*



*b*

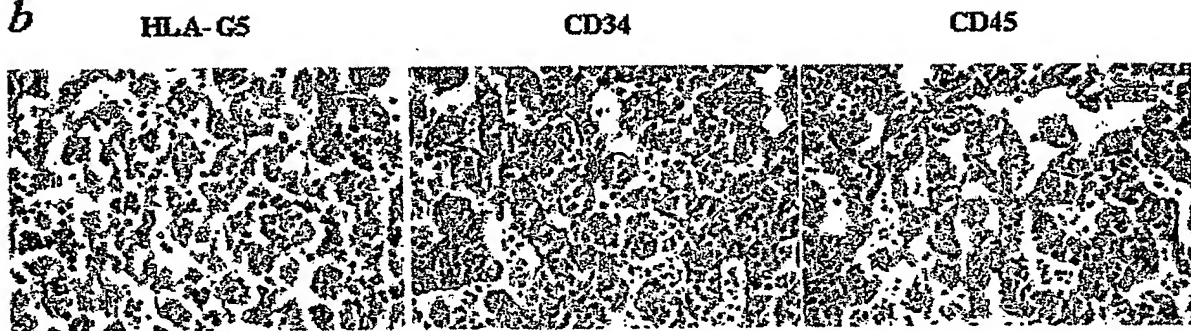


FIGURE 3

Embryo (Carnegie Stage)	Developmental Age (Days)	Number of somites	Length (mm)	Number of specimens	Number and Type of tissues
7	16	0		2	2 YS
10	22-23	4-12	2.5	3	3 YS, 2 PV
11	24-25	13-20	2.5	1	1 E, 1 YS, 1 PV
12	26-27	21-29	4	3	2 E, 1 YS, 3 PV
13	28-30	30-35	4.5	3	1 E, 1 YS, 3 PV
14	31-32	*	4	2	2 E, 1 YS, 2 PV
16	38-40		6-8	1	1 E, 1 YS, 1 PV
17	41-43		11-12	2	1 E, 1 YS, 1 PV
19	48-49		15-17	1	1 E, 1 PV
20	50-51		18-23	1	1 E, 1 PV
<b>Fetus</b>	13 weeks			1	L, S, BM
	15			1	L, S, BM
	16			1	L, S, BM
	26			1	L, S, BM
	34			1	L, S, BM
<b>Children</b>	2 years			1	BM
	5			1	BM
<b>Adult</b>	40			1	BM
	67			1	BM
	82			1	BM

\* From this stage on, the number of somites is difficult to determine and thus is not useful criterion

PV: placental villi; E: embryo; L: liver; S: Spleen; BM: bone marrow.

FIGURE 4

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ ~~FADED~~ TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**